

教授就任総説

象牙芽細胞の分化と細胞外基質

岩本 勉

キーワード：象牙芽細胞，象牙質，細胞外基質

Role of Extracellular Matrix in Odontoblast Differentiation

Tsutomu IWAMOTO

Abstract: Tooth development is a complex process that includes interactions between oral epithelium-derived dental epithelial cells and neural crest-derived dental mesenchymal cells. In this process, the basement membrane at the epithelial-mesenchymal interface plays important roles in matrix-mediated cell interactions and for trapping growth factors, then dental epithelial and mesenchymal cells differentiate into enamel-forming ameloblasts and dentin-forming odontoblasts, respectively. For enamel and dentin formation, these cells produce large amounts of extracellular matrixes, thus cell-matrix and cell-cell interactions are crucial for both ameloblast and odontoblast differentiation. In this review, we focus on the role of the extracellular matrix in odontoblast differentiation. Dentin and bone are similar in several aspects, such as extracellular matrix composition and genetic diseases, which affect both bone and dentin mineralization, common between them. However, the process of odontoblast differentiation is completely different from that of osteoblast differentiation. For better understanding of tooth development, it is important to elucidate the differences between these cell types.

I. 緒 言

上皮細胞と間葉細胞によって作られる歯は非常に高度化した組織である。歯冠部は咀嚼器官として、その外側はエナメル質で覆われ、生物組織で最も硬い。歯根部ではその外側がセメント質で覆われ、臍組織に類似した歯根膜を介して骨と接着している。歯の中心には血管、神経線維、そして象牙芽細胞に繋がる神経終末を含む特殊な結合組織である歯髄組織が存在する。そして、これらを支える歯の主要な構成成分が象牙質である。象牙質は、歯全体の根幹をなす大部分を占める。エナメル質が重量比で約96%が無機質であるのに対し、象牙質は重量比で約65-70%が無機質である。象牙質の残りの約20%が有機質、約10%が水である。また、象牙質は主

要な細胞外基質が骨と非常に類似しており、その異常によって引き起こされる疾患が、象牙質と骨に同時に異常を生じることあることから、骨と多くの点で共通していることが知られている。しかしながら、象牙質と骨は全く異なる起源と性質を有している。

近年の再生研究の急速な発展によって、再生医療への期待は非常に高まってきており、歯科においても例外ではない。失われた歯を再生させる、これができれば歯科においては究極の再生治療になる。しかしながら、現実的にはその実現性はまだ遠く、現在の知識で歯様の構造体での再生医療は近い将来に可能かもしれないが、歯そのものを完全に再生する技術開発には、まだ歯の発生メカニズムに対する理解が不足しており、取り組むべき課

題が多いと考える。

特に歯の核をなす象牙質においては、前述した骨と類似した細胞特性があり、多くの幹細胞を用いた分化誘導実験で、骨芽細胞と象牙芽細胞が明確に区別されずに解釈されるケースも多い。従って、象牙芽細胞の分化を理解する為には、象牙芽細胞—象牙質、骨芽細胞—骨のそれぞれの違いを常に整理する必要があると考える。本稿では、細胞外基質の視点を中心に象牙質形成を今一度整理してみたい。

II. 象牙質と骨の類似点

象牙質と骨は、元々の細胞源は異なる。骨芽細胞は間葉形幹細胞に由来するが、象牙芽細胞は頭部神経堤由来の外胚葉性間葉細胞に由来する。由来は違うものの、そこで働く遺伝子群や石灰化組織としてそれらの形成機構に関与する分子群においては多くの共通点がみられる。代表的な転写因子である Runx2¹⁾, Osterix/SP7²⁾, Msx2³⁾, Twist1⁴⁾ 等は象牙芽細胞や骨芽細胞の増殖、分化において類似した機能を有する。その結果、BMPs, FGFs, Wnts といった主要な成長因子の発現や機能⁵⁻⁷⁾においても共通性が現れてくる。さらに、石灰化の進行メカニズムについても共通する点が多い。両者は有機質成分として主に I 型コラーゲンと非コラーゲン性蛋白質で構成しており、無機成分としては水酸化アパタイト結晶である。象牙質形成や骨形成の過程は、それぞれ象牙前質、オステオイドと呼ばれる未石灰化の有機性基質層が最初に形成され、そこが足場となって、カルシウムやリン酸塩の無機塩の沈着によって石灰化層が形成される。余談ではあるが、エナメル質は象牙質が核となって石灰化のプロセスが進行すると考えられている。さて、非コラーゲン性蛋白質はこの石灰化のプロセスの開始段階で重要な役割を担っており、I 型コラーゲンと結合することによって、コラーゲン原繊維の形成を支援し、石灰化の骨組みを作る働きや水酸化アパタイト結晶の成長に関係する^{8,9)}。このことは象牙質および骨に共通した非コラーゲン性蛋白質であるスモールインテグリン結合リガンド N 連結糖蛋白質 (SIBLINGs) ファミリーの異常によって、石灰化の異常が引き起こされることによって証明されている¹⁰⁻¹³⁾。SIBLINGs ファミリーには、象牙質シアロ・リン蛋白質 (DSPP)¹⁴⁾、デンティンマトリックスプロテイン-1 (DMP-1)¹⁵⁾、骨シアロ蛋白質 (BSP)¹⁶⁾、オステオポンチン¹⁷⁾、MEPE¹⁸⁾ 等が知られている。また、骨基質 Gla 蛋白質であるオステオカルシン¹⁹⁾ や、Ca 結合蛋白質であるオステオネクチン²⁰⁾ といった骨代謝に重要な蛋白質も共通して象牙質に発現している。

III. 象牙質と骨の相違点

象牙質と骨は前項で述べたように、象牙芽細胞や骨芽細胞の分化において共通した遺伝子制御機構を有してい

ることやそれらの成分を比較すると非常に類似していることから、同じように扱われることがあるが、全く異なる組織である。一番の大きな違いは、骨は常にリモデリングが起こりダイナミックに変化をする組織で、カルシウムの恒常性に関わっているが、象牙質は一度作られるとそれ自体ターンオーバーすることはない点である。また、骨芽細胞は細胞外基質を産生しながら、最終的に自身が基質内に埋もれていくが、象牙芽細胞は基本的に象牙突起を基質内に留めるものの細胞体は決して埋もれることはない。しかし、病的機序や治癒機転が働いた場合には、細胞が封入され、血管や細い空隙構造を伴う骨様象牙質 (osteodentin) が形成される。ただし、この場合、細胞の供給源自体についても議論の余地がある。すなわち、それは歯髄中には血管が存在するために、間葉系幹細胞が侵入しやすい環境となっているからである。

IV. 象牙芽細胞の分化

象牙芽細胞は頭部神経堤由来の外胚葉性間葉細胞である歯乳頭細胞から分化する。歯乳頭細胞は内エナメル上皮細胞と基底膜で隔たれており、内エナメル上皮から分泌されるパラクライン因子が、基底膜に存在するヘパラン硫酸を介して、その分化が誘導されると考えられている。すなわち、上皮—間葉の相互作用である²¹⁾。この為に、基底膜に接した細胞だけが象牙芽細胞に分化するのである。このステップは次のように解説される²²⁾。1) 前象牙芽細胞で細胞分裂が止まり、最後に分裂した娘細胞が基底膜に沿って垂直に配列する。2) 基底膜に配列した娘細胞は背丈が伸び、極性が出現し、細胞骨格が変化する。3) 象牙芽細胞は象牙芽細胞突起を伸ばしながら、象牙基質を産生し、歯髄側へ移動を開始する。象牙前質と呼ばれる未石灰化の有機性基質層が形成され、そこが足場となって、カルシウムやリン酸塩の無機塩の沈着によって石灰化層が形成され象牙質が形成される。この象牙前質が形成される過程で基底膜は消失する。

V. 象牙芽細胞の分化と基底膜

歯の発生過程の基底膜は、主として IV 型コラーゲン、ラミニン、エンタクチン (ナイトジェン)、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ファイブロネクチン、テネイシン、III 型コラーゲンで構成されている^{23,24)}。このうち、IV 型コラーゲン、ラミニン、エンタクチン (ナイトジェン) は、歯の基底膜の主要な構成成分であるが、歯の発生の初期から、基底膜が消失するまでの間の時期特異的な発現の変化は観察されない。しかしながら、ヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸、ファイブロネクチン、テネイシンは、歯の発生の時期によって、その発現が変化することが知られている^{23,25-28)}。ヘパラン硫酸は帽状期から咬頭のパターンが形成される時期の間、一時的に消失し、その後、象牙芽細胞が分化する時期に再び発現する²⁵⁾。ヘパラン硫酸プロテオグリカン・パールカンは、歯の発

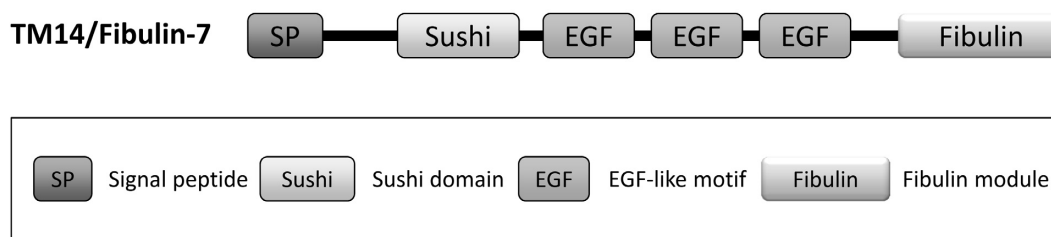


図1 TM14は、Fibulin ファミリーに属し、細胞外基質分子 Fibulin-7である。マウス TM14は、440のアミノ酸から構成され、N末端からシグナル配列（SP）、蛋白結合領域として考えられる Sushi ドメイン、EGF 様ドメイン、そしてC末側に Fibulin 様ドメインからなる。

生段階において、基底膜、エナメル器の細胞間、歯乳頭間葉細胞間に発現している²⁹⁾。コンドロイチン硫酸は、歯堤および蕾状期の基底膜に均一に発現するが、形態形成が始まる時期には咬頭が形成される付近に局限した発現を示す²⁶⁾。ファイブロネクチンは基底膜に発現しているが、象牙芽細胞の分化が始まるとその頂側膜（apical）に集積してくる³⁰⁾。このことによって、細胞膜表面のファイブロネクチン受容体の位置が変化することによって、象牙芽細胞の極性に関与していると考えられている²⁷⁾。また、テネイシンもファイブロネクチン同様に、象牙芽細胞の分化が始まる時に基底膜に集積し、ファイブロネクチンと相互作用をし、象牙芽細胞の極性や分化に関わっていると考えられている^{28, 31)}。主として、ラミニンはエナメル芽細胞の分化と維持に関わっているが、ラミニン $\alpha 2$ の欠損マウスでは象牙質の形成異常が観察され、象牙芽細胞の分化に重要な役割があることが示唆されている^{32, 33)}。一般の組織において、基底膜は主に上皮細胞の接着、分化形質の維持や、分化促進、細胞移動との関連がいわれているが、象牙芽細胞も同様に基底膜に沿った細胞の配列、極性の出現でその分化が促進されることから、基底膜が象牙質形成に果たす役割について、十分な検討が必要と考える。

VI. 細胞極性

細胞の極性という側面から考えた場合、一般の上皮細胞は、タイトジャンクションによって、頂側膜（apical）側と基底膜（basal）側に物理的に隔てられ、基底膜とは反対側が分泌側になるが、歯においては、エナメル芽細胞も象牙芽細胞も basal 側が分泌側になる。細胞膜の水透過性を調整する Aquaporin と呼ばれる水チャンネルのうち、Aquaporin 4は basal 側、Aquaporin 5は apical 側のマーカーとして用いられることがあるが、象牙芽細胞においては、これらがともに basal 側に出現している³⁴⁾。このことから、通常の上皮細胞のように頂側膜と基底膜側が対側にあるのとは異なっていることがわかる。象牙芽細胞におけるタイトジャンクションは、分化に伴って徐々に Zo-1 の発現が上昇することが知られており³⁵⁾、また、Occludin は象牙芽細胞の分化の初期に

発現がみられ、分化が進むと発現が消失するが、一方で Claudin-1 については最終分化が進んだ時にその発現がみられる³⁶⁾。このように時期特異的なタイトジャンクションが発現していることが知られている。また、骨芽細胞においてもこれらタイトジャンクションファミリーの発現は知られており³⁷⁾、骨芽細胞が常に同じ方向に骨を作り続けるためには、細胞極性が重要なかもしれない。多くの骨芽細胞は骨基質形成後アポトーシスを起こすと考えられており³⁸⁾、その残りが、類骨面で休止期骨芽細胞（bone lining cell）になるか、あるいは骨基質に取り込まれ、骨細胞になるとされている。In vivo において、休止期骨芽細胞でタイトジャンクションの発現が観察されているが、骨細胞となった場合、タイトジャンクションの発現は観察されない³⁷⁾。

しかしながら、どのようにして、骨芽細胞が骨基質に埋もれ骨細胞へと移行するのかまだその詳細な機構は解明されていない。一方で、象牙質形成を考える場合、細胞がどのようにして基質から列を成して離れていくのかその詳細な機構も明らかにされていない。

VII. TM14/Fibulin-7

我々は歯の発生過程でどのような遺伝子が働き、どのような分子間相互作用が働いているのか解析を試みている。その中で象牙芽細胞において、新奇細胞外基質分子として TM14 の同定に成功した³⁹⁾。TM14は、440のアミノ酸からなり、N末からシグナルペプチド、3つのEGF様ドメインがあり、C末にはFibulin様ドメインを有しており（図1）、新奇のFibulinファミリーの1つとして、TM14/Fibulin-7と命名した^{39, 40)}。TM14はマウスの歯胚において、象牙前質や象牙細管にその発現がみられた。In vitro において、歯乳頭由来間葉細胞株やマウス歯髄初代培養細胞は、ファイブロネクチンに対しては、濃度依存的な細胞接着活性を示したが、TM14に対しては、ある一定の濃度までは細胞接着活性を示したものの、逆に高濃度になると細胞接着活性が減弱した³⁹⁾。このことは象牙芽細胞が基質に埋もれずに後退する機構に関与していることが示唆され、TM14の発見と解析は象牙質形成メカニズム解明に向けた大きなヒントを与えて

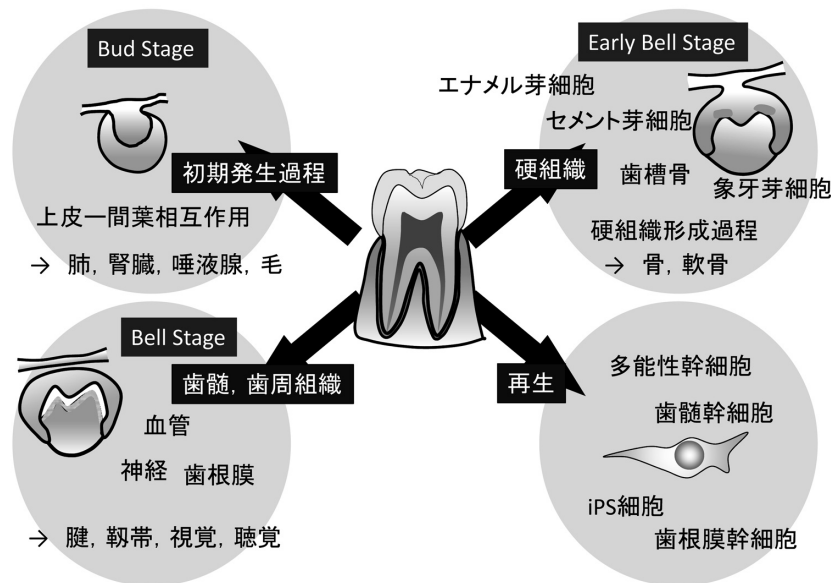


図2 歯の初期発生過程は肺や腎臓、唾液腺、毛等の他の外胚葉性器官と共通している。また、硬組織や感覚器としても他の臓器と共通する機構を有しているため、歯から得られた知見を多臓器に応用することが可能である。さらに、近年では幹細胞の供給源としても注目されている。

くれることが期待される。

VIII. まとめ

歯は生命活動を営む上で極めて重要な咀嚼器官のひとつであるにも関わらず、修復象牙質を作るというだけで、その再生修復機構は極めて乏しく、野生の動物は歯を失うとその命も危うくなってくる。ヒトは補綴治療によって、その機能を補完する能力を身につけてきた。しかしながら、天然歯と同等の能力を兼ね備えた補綴物はまだ誕生していない。ヒトの一生を考えると高齢期では人工物による代替物でもよいのかもしれないが、小児歯科臨床においては生まれながらに歯がない子ども達に對峙することがある。幼くして義歯を使うことになるわけだから、小児歯科医として色々な面で苦悶してしまう。患児本人は私の比ではないのは言うまでもない。歯そのものを再生する治療というのは、現在では夢物語かもしれないが、そのような日が一日でも早く来るように、歯そのものを再生させる技術開発が進むことを期待したい。

また、歯は複雑化した器官であり、歯の発生の理解は歯だけに留まらず、人体の多くの器官や組織、細胞に応用可能な有意義な知見をもたらしてくれる(図2)。それ故、その成果が新たな生物学的概念の発見や多領域における新規の診断法、治療法の開発にも結びつく可能性もあり、今後も益々歯の発生研究が発展することを切に願っている。

謝 辞

稿を終えるにあたり、四国歯学会会長市川哲雄教授な

らびに四国歯学会編集委員の皆様に心より深謝申し上げます。

文 献

- 1) Camilleri S and McDonald F: Runx2 and dental development. Eur J Oral Sci 114, 361-373 (2006)
- 2) Chen S, Gluhak-Heinrich J, Wang YH, Wu YM, Chuang HH, Chen L, Yuan GH, Dong J, Gay I and MacDougall M: Runx2, osx, and dspp in tooth development. J Dent Res 88, 904-909 (2009)
- 3) Bidder M, Latifi T and Towler DA: Reciprocal temporospatial patterns of Msx2 and Osteocalcin gene expression during murine odontogenesis. J Bone Miner Res 13, 609-619 (1998)
- 4) Li Y, Lu Y, Maciejewska I, Galler KM, Cavender A and D'Souza RN: TWIST1 promotes the odontoblast-like differentiation of dental stem cells. Adv Dent Res 23, 280-284 (2011)
- 5) Begue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV and Lesot H: Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. Int J Dev Biol 38, 405-420 (1994)
- 6) Unda FJ, Martin A, Hernandez C, Perez-Nanclares G, Hilario E and Arechaga J: FGFs-1 and -2, and TGF beta 1 as inductive signals modulating in vitro odontoblast differentiation. Adv Dent Res 15, 34-37 (2001)

- 7) Yamashiro T, Zheng L, Shitaku Y, Saito M, Tsubakimoto T, Takada K, Takano-Yamamoto T and Thesleff I: Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *Differentiation* 75, 452-462 (2007).
- 8) Traub W, Arad T and Weiner S: Origin of mineral crystal growth in collagen fibrils. *Matrix* 12, 251-255 (1992)
- 9) He G, Gajjaraman S, Schultz D, Cookson D, Qin C, Butler WT, Hao J and George A: Spatially and temporally controlled biomineralization is facilitated by interaction between self-assembled dentin matrix protein 1 and calcium phosphate nuclei in solution. *Biochemistry* 44, 16140-16148 (2005)
- 10) Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, Longenecker G, D'Souza R, Hong S, Wright JT, MacDougall M, Sauk J and Kulkarni AB: Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. *J Biol Chem* 278, 24874-24880 (2003)
- 11) Sun Y, Lu Y, Chen L, Gao T, D'Souza R, Feng JQ and Qin C: DMP1 processing is essential to dentin and jaw formation. *J Dent Res* 90, 619-624 (2011)
- 12) Sun Y, Prasad M, Gao T, Wang X, Zhu Q, D'Souza R, Feng JQ and Qin C: Failure to process dentin matrix protein 1 (DMP1) into fragments leads to its loss of function in osteogenesis. *J Biol Chem* 285, 31713-31722 (2010)
- 13) Alford AI and Hankenson KD: Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling and regeneration. *Bone* 38, 749-757 (2006)
- 14) D'Souza RN, Bronckers AL, Happonen RP, Doga DA, Farach-Carson MC and Butler WT: Developmental expression of a 53 KD dentin sialoprotein in rat tooth organs. *J Histochem Cytochem* 40, 359-366 (1992)
- 15) Qin C, D'Souza R and Feng JQ: Dentin matrix protein 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis. *J Dent Res* 86, 1134-1141 (2007)
- 16) Chen JK, Shapiro HS, Wrana JL, Reimers S, Heersche JN and Sodek J: Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by in situ hybridization. *Matrix* 11, 133-143 (1991)
- 17) Butler WT: The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res* 23, 123-136 (1989)
- 18) Wang H, Kawashima N, Iwata T, Xu J, Takahashi S, Sugiyama T and Suda H: Differentiation of odontoblasts is negatively regulated by MEPE via its C-terminal fragment. *Biochem Biophys Res Commun* 398, 406-412 (2010)
- 19) Bronckers AL, Gay S, Finkelman RD and Butler WT: Immunolocalization of Gla proteins (osteocalcin) in rat tooth germs: comparison between indirect immunofluorescence, peroxidase-antiperoxidase, avidin-biotin-peroxidase complex, and avidin-biotin-gold complex with silver enhancement. *J Histochem Cytochem* 35, 825-830 (1987)
- 20) Reichert T, Storkel S, Becker K and Fisher LW: The role of osteonectin in human tooth development: an immunohistological study. *Calcif Tissue Int* 50, 468-472 (1992)
- 21) Tucker AS and Sharpe PT: Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place. *J Dent Res* 78, 826-834 (1999)
- 22) Ruch JV, Lesot H and Begue-Kirn C: Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 39, 51-68 (1995)
- 23) Thesleff I, Barrach HJ, Foidart JM, Vaheri A, Pratt RM and Martin GR: Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan, and fibronectin during mouse tooth development. *Dev Biol* 81, 182-192 (1981)
- 24) Timpl R: Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* 8, 618-624 (1996)
- 25) Kogaya Y, Kim S and Akisaka T: Changes in ultrastructural distribution of dental basement membrane heparan sulfate during early mouse tooth development. *J Biol Buccale* 18, 109-115 (1990)
- 26) Mark MP, Baker JR, Morrison K and Ruch JV: Chondroitin sulfates in developing mouse tooth germs. An immunohistochemical study with monoclonal antibodies against chondroitin-4 and chondroitin-6 sulfates. *Differentiation* 43, 37-50 (1990)
- 27) Sawada T and Nanci A: Spatial distribution of enamel proteins and fibronectin at early stages of rat incisor tooth formation. *Arch Oral Biol* 40, 1029-1038 (1995)
- 28) Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA, Beck K and Chiquet M: Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell* 53, 383-90 (1998)
- 29) Ida-Yonemochi H, Ohshiro K, Swelam W, Metwaly H and Saku T: Perlecan, a basement membrane-type heparan sulfate proteoglycan, in the enamel organ: its intraepithelial localization in the stellate reticulum. *J Histochem Cytochem* 53, 763-772 (2005)
- 30) Ruch JV: Determinisms of odontogenesis. *Revis Biol Celular* 14, 1-99 (1987)
- 31) Thesleff I, Mackie E, Vainio S and Chiquet-Ehrismann R: Changes in the distribution of tenascin during tooth development. *Development* 101, 289-296 (1987)
- 32) Yoshida K, Yoshida N, Aberdam D, Meneguzzi G,

- Perrin-Schmitt F, Stoetzel C, Ruch JV and Lesot H: Expression and localization of laminin-5 subunits during mouse tooth development. *Dev Dyn* 211, 164-176 (1998)
- 33) Yuasa K, Fukumoto S, Kamasaki Y, Yamada A, Fukumoto E, Kanaoka K, Saito K, Harada H, Arikawa-Hirasawa E, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Okamoto K, Kato Y and Fujiwara T: Laminin alpha2 is essential for odontoblast differentiation regulating dentin sialoprotein expression. *J Biol Chem* 279, 10286-10292 (2004)
- 34) Tjaderhane L, Koivumaki S, Paakkonen V, Ilvesaro J, Soini Y, Salo T, Metsikko K and Tuukkanen J: Polarity of Mature Human Odontoblasts. *J Dent Res* 92, 1011-1016 (2013)
- 35) Arana-Chavez VE and Katchburian E: Development of tight junctions between odontoblasts in early dentinogenesis as revealed by freeze-fracture. *Anat Rec* 248, 332-338 (1997)
- 36) Joao SM and Arana-Chavez VE: Tight junctions in differentiating ameloblasts and odontoblasts differentially express ZO-1, occludin, and claudin-1 in early odontogenesis of rat molars. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 277, 338-343 (2004)
- 37) Wongdee K, Pandaranandaka J, Teerapornpuntakit J, Tudpor K, Thongbunchoo J, Thongon N, Jantarajit W, Krishnamra N and Charoenphandhu N: Osteoblasts express claudins and tight junction-associated proteins. *Histochem Cell Biol* 130, 79-90 (2008)
- 38) Jilka RL, Weinstein RS, Parfitt AM and Manolagas SC: Quantifying osteoblast and osteocyte apoptosis: challenges and rewards. *J Bone Miner Res* 22, 1492-1501 (2007)
- 39) de Vega S, Iwamoto T, Nakamura T, Hozumi K, McKnight DA, Fisher LW, Fukumoto S and Yamada Y: TM14 is a new member of the fibulin family (fibulin-7) that interacts with extracellular matrix molecules and is active for cell binding. *J Biol Chem* 282, 30878-30888 (2007)
- 40) de Vega S, Iwamoto T and Yamada Y: Fibulins: multiple roles in matrix structures and tissue functions. *Cell Mol Life Sci* 66, 1890-1902 (2009)